

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 11001477 A

(43) Date of publication of application: 06 . 01 . 99

(51) Int. Cl

C07D243/24
A61K 31/55
A61K 31/55
A61K 31/55
C07D403/06

(21) Application number: 09170983

(22) Date of filing: 12 . 06 . 97

(71) Applicant: HOKURIKU SEIYAKU CO LTD

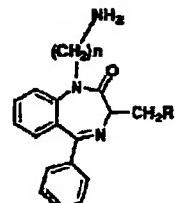
(72) Inventor: WATANABE YOSHINARI
KIMURA TATSUYA
KABURAGI HIROSHI
IWASAKI NOBUHIKO
IKEDA YOSHITAKA

(54) 1,4-BENZODIAZEPINE AND USE THEREOF

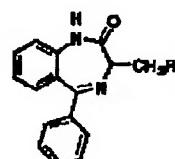
(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new compound, having an excellent affinity for a thrombopoientin receptor and useful as an agent capable of manifesting regulating actions on the blood platelet production.

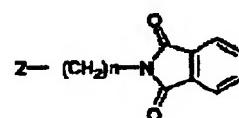
SOLUTION: This 1,4-benzodiazepine derivative is represented by formula I [R is phenyl or indolyl; (n) is 2-6] or its salt, e.g. (\pm)-1-(2-aminoethyl)-1,3-dihydro-5-phenyl-3-(phenylmethyl)-2H-1,4-benzodiazepin-2-one. The compound represented by formula I is obtained by reacting a compound represented by formula II with a compound represented by formula III (Z is an eliminable group such as a halogen or mesyloxy) in the presence of a base and then reacting the resultant compound with hydrazine hydrate or methylamine in a polar solvent such as ethanol. The compound represented by formula I is effective against morbid states of blood diseases associated with an abnormality in the number of blood platelets.



I



II



III

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-1477

(43)公開日 平成11年(1999)1月6日

(51)Int.Cl.⁶
C 07 D 243/24
A 61 K 31/55
ACB
AED
C 07 D 403/06

識別記号
5 0 6
ABY
ACB
AED
2 0 9

F I
C 07 D 243/24
A 61 K 31/55
ACB
AED
C 07 D 403/06
2 0 9

審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全8頁)

(21)出願番号 特願平9-170983

(22)出願日 平成9年(1997)6月12日

(71)出願人 000242822

北陸製薬株式会社

福井県勝山市猪野口37号1番地1

(72)発明者 渡辺 良成

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72)発明者 木村 達也

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72)発明者 燕城 博

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

最終頁に続く

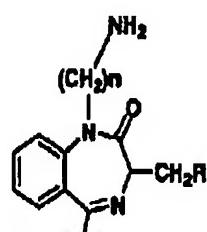
(54)【発明の名称】 1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体及びその用途

(57)【要約】

【課題】トロンボポエチンレセプターに優れた親和性を
有し、血小板産生調節作用を持つ薬剤を提供する。

【解決手段】次の一般式

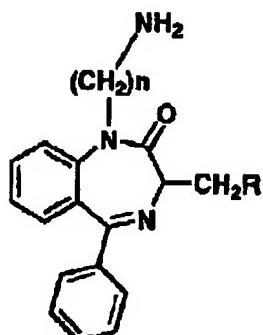
【化1】



【特許請求の範囲】

【請求項1】次の一般式

【化1】



(式中、Rはフェニル基又はインドリル基を表し、nは2～6の整数を表す。)で示される1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩。

【請求項2】請求項1に記載の1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩を有効成分とする血小板産生調節剤。

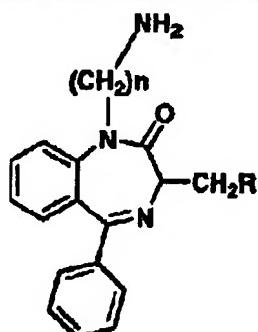
【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、巨核球造血、血小板産生に深く関わるトロンボポエチンレセプターに親和性を有し、血小板産生調節作用を持つ新規な1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩、及びその用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血小板は生体の止血、血栓形成において主要な役割を果たす血液有形成分である。血小板は骨髄幹細胞から巨核球前駆細胞より骨髄で分化、成熟して生じた巨核球より血中に放出され、その寿命は約10日であり、その数は長期にわたって一定の値を保つことが知られていた。この巨核球造血の過程の主要な因子であるトロンボポエチンの遺伝子が最近クローニングされた〔ネイチャー(Nature), 369巻, 533頁(1994年)〕。トロンボポエチンはc-mplがコードしているタンパク質(トロンボポエチンレセプター: MPL)のリガンドであり、巨核球前駆細胞から巨核球細胞の増殖と分化成熟を刺激*



(式中、Rはフェニル基又はインドリル基を表し、nは2～6の整数を表す。)で示される新規な1, 4-ベン

*し、さらに血小板産生を増加させることも判明した〔ネイチャー, 369巻, 568頁(1994年)〕。

【0003】トロンボポエチンレセプターを介して血小板産生を調節する生理活性物質としては、トロンボポエチンそのものの他、低分子ペプチドなどにもトロンボポエチンレセプター親和性があることが知られてきている(WO96/40189号、WO96/40750号明細書)。

【0004】

10 【発明が解決しようとする課題】トロンボポエチンや上記低分子ペプチドなどの生理活性物質は、トロンボポエチンレセプターを介して血小板産生を調節し、血小板数の異常を伴う種々の血液疾患の病態に対して優れた薬剤として期待されている。しかしながら、トロンボポエチンは332個のアミノ酸からなるポリペプチドサイトカインであり、薬剤として用いる場合、消化管内で分解されると予測され、注射剤としては利用できるが、経口投与製剤としては実用的ではないと考えられる。また、トロンボポエチンレセプターに親和性を有する低分子ペプチドも、経口投与の可能性が未知数であることなどから、優れたトロンボポエチンレセプター親和性を有し経口投与可能な、低分子非ペプチド化合物の開発が望まれている。

20 【0005】本発明の課題は、優れたトロンボポエチンレセプター親和性を有し、且つ経口投与可能な低分子非ペプチド化合物を見いだし、血小板数の異常を伴う種々の病態に対し優れた効果が期待できる治療薬を提供することにある。

【0006】

30 【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明に係る1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩が、優れたトロンボポエチンレセプター親和性を有することを見いだし、本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明は次の一般式(I)

【化2】

(I)

【0008】本発明の前記一般式(I)で示される化合物と類似構造を有する1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体

リー(Journal of Medicinal Chemistry), 30巻, 1229頁(1987年)等においては、CCK拮抗剤として開示され、またWO95/14470号ではカリウムイオン遮断による不整脈治療剤として開示されてはいるが、これら文献には本発明に係るトロンボポエチンレセプター親和性については全く触れられていない。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の前記一般式(I)において、Rで示されるフェニル基又はインドリル基は、適宜置換していてもよく、又 $(CH_2)_n$ で示されるアルキレン鎖としては、例えば、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン鎖が挙げられる。また、本発明の前記一般式(I)で示される化合物には、不斉に基づく異性体が存在し得るが、本発明にはこれらの異性体及びその混合物も包含される。

【0010】本発明の前記一般式(I)で示される化合物は、所望に応じて薬理学的に許容しうる塩に変換することも、又は生成した塩から遊離塩基に変換することもできる。本発明の薬理学的に許容しうる塩としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、磷酸等の鉱酸塩、あるいは、酢酸、マレイン酸、フマル酸、クエン酸、シュウ酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、10-カンファースルホン酸等の有機酸塩等が挙げられる。

【0011】本発明の1,4-ベンゾジアゼピン誘導体の好ましい態様としては、以下の化合物及びそれらの薬理学的に許容しうる塩を挙げることができるが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

(1) (±)-1-(2-アミノエチル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(2) (±)-1-(3-アミノプロピル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(4) (±)-1-(5-アミノペンチル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(5) (±)-1-(6-アミノヘキシル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

10 (6) (±)-1-(2-アミノエチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(7) (±)-1-(3-アミノプロピル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(8) (±)-1-(4-アミノブチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

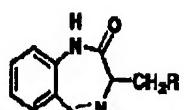
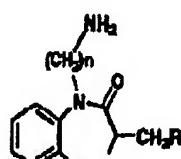
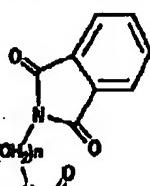
(9) (±)-1-(5-アミノペンチル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

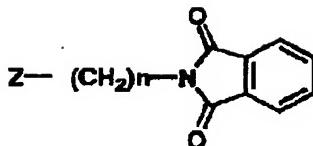
(10) (±)-1-(6-アミノヘキシル)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

30 【0012】本発明の前記一般式(I)で示される化合物は、以下の方法により製造することができるが、当該化合物の製造方法は、この方法に限定されるわけではない。

【0013】

【化3】





(Zは塩素原子等のハロゲン原子又はメシルオキシ基等の脱離基を表し、nは前述と同意義を表す。)で示される化合物とを、N,N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等の不活性溶媒中、水素化ナトリウム、リチウムジイソプロピルアミド等の塩基の存在下で、0℃から溶媒の還流温度までの範囲で反応させることにより、一般式(III)の化合物を得ることができる。

【0015】工程2においては、一般式(III)の化合物をエタノール等の極性溶媒中、抱水ヒドラジン又はメチルアミンと反応させることにより、本発明に係る前記一般式(I)の化合物を得ることができる。

【0016】このようにして製造される前記一般式

(I)で示される新規な1,4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩の少なくとも1つを有効成分として含有する医薬は、通常、カプセル剤、錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの経口投与剤、あるいは注射剤として投与される。これらの製剤は、薬理学的、製剤学的に許容しうる添加剤を加え、常法により製造することができる。即ち経口剤にあっては、賦形剤(乳糖、D-マンニトール、トウモロコシデンプン、結晶セルロース等)、崩壊剤(カルボキシメチセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等)、結合剤(ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等)、滑沢剤(ステアリン酸マグネシウム、タルク等)、コーティング剤(ヒドロキシプロピルメチセルロース、白糖、酸化チタン等)、可塑剤(ポリエチレングリコール等)等の製剤用成分が、注射剤にあっては水性あるいは用時溶解型剤型を構成しうる溶解剤ないし溶解補助剤(注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等)、pH調節剤(無機又は有機の酸あるいは塩基)、等張化剤(食塩、ブドウ糖、グリセリン等)、安定化剤等の製剤成分が使用される。

【0017】

【実施例】以下、本発明を例によって説明するが、本発明はこれらの例の特定の細部に限定されるものではない。

【0018】例1

(±)-N-[2-[2,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル]エチル]フタルイミド

(±)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン3.00g, 60%水素化ナト

リウム0.34g及びN,N-ジメチルホルムアミド60mlの混合物を氷冷下1.5時間攪拌後、N-(2-プロモエチル)フタルイミド4.60gを加え、室温で16時間攪拌した。反応混合物に水200mlを加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ジクロロメタン→ジクロロメタン:メタノール=20:1)により精製し、微黄色結晶0.94gを得た。この結晶の一部をジクロロメタン:酢酸エチル(3:1)の混合溶媒より再結晶して、融点224.5~228.5℃の微黄色結晶を得た。

元素分析値 C₃₄H₂₆N₄O₃
理論値 C, 75.82; H, 4.87; N, 10.40

実験値 C, 75.72; H, 4.90; N, 10.36
【0019】例2
(±)-N-[3-[2,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル]プロピル]フタルイミド

(±)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン3.00g, 60%水素化ナトリウム0.34g及びN,N-ジメチルホルムアミド60mlの混合物を氷冷下1.5時間攪拌後、N-(3-プロモプロピル)フタルイミド4.50gを加え、室温で16時間攪拌した。反応混合物に水200mlを加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラ

フィー(シリカゲル、ジクロロメタン:メタノール=20:1)により精製し、微黄色結晶3.36gを得た。この結晶の一部をジクロロメタン:酢酸エチル(2:1)の混合溶媒より再結晶して、融点213~216℃の微黄色結晶を得た。

元素分析値 C₃₅H₂₈N₄O₃

理論値 C, 76.07; H, 5.11; N, 10.14

実験値 C, 75.85; H, 4.88; N, 10.12
【0020】例3
(±)-N-[4-[2,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル]ブチル]フタルイミド

(±)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン3.00g, 60%水素化ナト

リウム0.34g及びN,N-ジメチルホルムアミド60mlの混合物を氷冷下1.5時間攪拌後、N-(2-プロモエチル)フタルイミド4.60gを加え、室温で16時間攪拌した。反応混合物に水200mlを加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラ

ゾジアゼピン-2-オン 1. 50 g, 60%水素化ナトリウム 0. 17 g 及び N,N-ジメチルホルムアミド 30 ml の混合物を氷冷下 1 時間攪拌後、N-(4-ブロモプロピル) フタルイミド 2. 48 g を加え、室温で 16 時間攪拌した。反応混合物に水 100 ml を加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、ジクロロメタン:メタノール = 50 : 1) により精製し、黄色無晶形固体 2. 13 g を得た。

元素分析値 C₃₆H₃₀N₄O₃

理論値 C, 76.31; H, 5.34; N, 9.89

実験値 C, 76.18; H, 5.16; N, 9.85

【0021】例4

(±)-N-[3-[2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル]プロピル]フタルイミド

(±)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 3.00 g, 60%水素化ナトリウム 0.40 g 及び N,N-ジメチルホルムアミド 50 ml の混合物を氷冷下 1 時間攪拌後、N-(3-ブロモプロピル) フタルイミド 5.00 g を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応混合物に水 200 ml を加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘキサン:酢酸エチル = 2 : 1) により精製し、無色無晶形固体 4.40 g を得た。

元素分析値 C₃₃H₂₇N₃O₃

理論値 C, 77.17; H, 5.30; N, 8.18

実験値 C, 76.89; H, 5.63; N, 8.05

【0022】例5

(±)-1-(2-アミノエチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(±)-N-[2-[2, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル]エチル]フタルイミド 1.02 g, 抱水ヒドラジン 0.10 ml 及びエタノールの混合物を 10 時間加熱還流した。

放冷後、5%水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、ジクロロメタン:メタノール = 9 : 1) により精製し、黄橙色無晶形固体 0.15 g を得た。

IRスペクトル ν (KBr) cm⁻¹ : 3344, 1676

, 1604

NMRスペクトル δ (CDCl₃) ppm : 2.49(2H, s), 2.79(1H, q, J=6.5Hz), 2.89(1H, q, J=6.5Hz), 3.65(1H, dd, J=3.6Hz), 3.77-3.85(3H, m), 4.39(1H, td, J=13, 6.5Hz), 7.03-7.63(14H, m), 8.23(1H, s)

高分解能マススペクトル : C₂₆H₂₄N₄O

理論値 m/z : 408.1950

実験値 m/z : 408.1946

【0023】例6

(±)-1-(3-アミノプロピル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(±)-N-[3-[2, 3-ジヒドロ-3-(イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル]プロピル]フタルイミド 2.53 g, 抱水ヒドラジン 0.24 ml 及びエタノール 5.5 ml の混合物を 23 時間加熱還流した。放冷後、5%水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をアセトンより再結晶し、融点 169.5~171.5 °C の無色結晶 1.00 g を得た。

元素分析値 C₂₇H₂₆N₄O

理論値 C, 76.75; H, 6.20; N, 13.26

実験値 C, 76.43; H, 5.89; N, 13.03

【0024】例7

(±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(±)-N-[4-[2, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル]ブチル]フタルイミド 1.50 g, 抱水ヒドラジン 0.14 ml 及びエタノール 2.0 ml の混合物を 5 時間加熱還流した。

放冷後、5%水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (アルミナ、ジクロロメタン:メタノール = 20 : 1 → ジクロロメタン:メタノール = 9 : 1) により精製し、微褐色無晶形固体 0.81 g を得た。

IRスペクトル ν (KBr) cm⁻¹ : 3360, 1672

, 1602

NMRスペクトル δ (CDCl₃) ppm : 1.22-1.57(4H, m), 2.53(2H, dd, J=13.5, 6.5Hz), 3.63-3.71(2H, m), 3.78-3.84(2H, m), 4.44(1H, td, J=14, 7Hz), 7.05-7.65(14H, m), 8.01(1H, s)

高分解能マススペクトル : C₂₈H₂₈N₄O

理論値 m/z : 436.2263

実験値 m/z : 436.2263

【0025】例8

(±) -1-(3-アミノプロピル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(±)-N-[3-[2,3-ジヒドロ-2-オキソ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル]プロピル]フタルイミド 3.70 g, 抱水ヒドラジン 0.35 ml 及びエタノール 4.0 ml の混合物を 5.5 時間加熱還流した。放冷後、5%水酸化ナトリウム水溶液 2.0 ml を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(アルミナ、ジクロロメタン:メタノール=10:1)により精製し、淡桃色無晶形固体 0.99 gを得た。

IRスペクトル ν (KBr) cm⁻¹ : 3372, 1674, 1604

NMRスペクトル δ (CDCl₃) ppm : 1.52-1.66(2H, m), 2.44-2.52(2H, m), 3.60(2H, d, J=7Hz), 3.70(1H, ddd, J=14, 7, 5Hz), 3.79(1H, t, J=7Hz), 4.57(1H, td, J=14, 7Hz), 7.15-7.54(14H, m)

高分解能マススペクトル: C₂₅H₂₆N₂O

理論値 m/z : 383.1998

実験値 m/z : 383.2003

【0026】以下、本発明化合物の優れたトロンボポエチンレセプター結合親和性を確認するため、トロンボポエチンと被験化合物とのトロンボポエチンレセプターに対する競合実験を行い評価した。

【0027】試験例1

ヒトトロンボポエチンレセプター(MPL)発現プラスミドの構築

(1) まず、ブラークハイブリダイゼーション法により、MPL cDNAの全領域を保持するファージクローンを得た。このためにPCR 法によりヒト胎児肝cDNA (CLONTECH社製) からヒトMPL cDNAの一部を取得した。なお、MPL cDNAの開始コドンから終止コドンはGenBank M90102に、開始コドンの上流の配列はEMBL X73551 に登録されている。PCR のためのプライマーは、MPL の開始コドンのAから数えて331塩基から350 塩基の配列に基づいたセンスプライマー-5'-GTGCGTCCTCTTCCGCT-3' と、1888から1907塩基配列に基づいたアンチセンスプライマー-5'-TCA AGCGCTGCCAATAGC-3' を用いた。PCRは、Takara EX Ta q (宝酒造社製) により添付の反応バッファーを用い通常の条件で行った。このPCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、ゲルからSUPREC-01 (宝酒造社製) を用いて添付のプロトコールに従い回収した。回収したPCR 産物を、Rediprime DNA labelling system (アマシヤム社製) を用いて、添付のプロトコールに従い [α -³²P] dCTPでラベルし、プローブとした。これを用いて、Human Fetal Liver 5'-STRETCH cDNA library (CLONTECH社

製) から、添付のプロトコールに従い、MPL cDNAのコーディング全領域と少なくとも開始コドンより上流60塩基以上を保持するファージクローンを単離し、常法に従つてファージを調製した。

- (2) 次にPCR 法により、ヒトMPL 細胞外領域cDNA (1 から491 番目のアミノ酸配列) をコードするDNA を取得した。PCR のための鑄型は上記で得られたファージを用い、プライマーはMPL の開始コドンの28塩基上流から17 塩基の配列に基づいたセンスプライマー-5'-CTAAGGCAGGC ACACAG-3' と、486 から491 番目のアミノ酸配列に基づいたアンチセンスプライマー-5'-GGTGACCCAGCGGTCTCGGT GGC-3' を用いた。この際、MPL 細胞外領域タンパク質のC 末端領域が、ヒトIgG Fcと連結できるようにBstEIIサイトを入れ、さらに読み枠が一致するようにした。また、ヒトIgG Fc領域cDNAは、B. D. Bennett らの文献 (B. D. Bennett ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry), 266 卷, 23060 ~23067 頁, 1991 年) を参考にして、センスプライマー-5'-CGCGGTACCGACAAACTCA-3' とアンチセンスプライマー-5'-GCACTCATTACCCGGAGACAGGGA GA-3' を用いて、ヒト脾臓のQUICK-CLONE cDNA (CLONTECH社製) を材料として、PCR 法により取得した。このようにして得られたPCR 産物を、以下に述べる工程に従つてpCR3 (Invitrogen社製) に組込み、MPL 発現ベクターを構築した。
- (3) PCR で得られたMPL 細胞外領域cDNAとヒトIgG Fc領域cDNAを、EUKARYOTIC TA CLONING KIT (Invitrogen社製) を用いて添付のプロトコールに従い、pCR3哺乳細胞発現ベクターに挿入した後、大腸菌TOP10 に形質転換した。得られた形質転換体のうち、発現できる正しい方向に挿入された株を選び、この株を常法に従い大量培養した。この株から、常法に従いプラスミドを調製し、MPL (B)-pCR3、IgG Fc(B)-pCR3と命名した。
- (4) 約200 μ g のMPL(B)-pCR3 を、0.64 unitsのBstEII (東洋紡社製) と200 units のScaI (宝酒造社製) で切断後、これをアガロース電気泳動に供した。該プラスミドより、MPL cDNA領域を含む3085bpのDNA 断片を含むゲル断片を切り出し、そのゲル断片から常法によりDNA を抽出した。
- (5) 約20 μ g のIgG Fc(B)-pCR3を、40 unitsのBstEII (東洋紡社製) と80 unitsのScaI (宝酒造社製) で切断後、アルカリリフォスマターゼ (東洋紡社製) にて脱リン酸化後、これをアガロース電気泳動に供した。該プラスミドより、IgG Fc領域cDNAを含む4150bpのDNA 断片を含むゲル断片を切り出し、そのゲル断片からDNA を抽出した。
- (6) (4) で得たDNA 断片 (約30ng) と(5) で得たDNA 断片 (約20ng) を、4.6 units のT4 DNAライゲース (東洋紡社製) にて連結させた。エレクトロポレーション法により、大腸菌XL1-Blue株 (Stratagene社製) に形質転換

した。得られた形質転換体のうち、発現できる正しい方向に挿入された株を選び、この株を常法に従い大量培養した。この株から、常法に従いプラスミドを調製し、MPL-IgG Fc (B)/pCR3と命名した。

【0028】試験例2

ヒトIgG Fc領域融合ヒトMPL タンパク質 (MPL-IgG)を安定に発現するヒト胎児293 細胞の作製とMPL-IgG の精製

MPL-IgG Fc (B)/pCR3で、エレクトロポレーション法〔渡辺良成：組織培養の技術 第三版【応用編】（日本組織培養学会編），501～503 頁，1996年〕によりヒト胎児293 細胞を形質転換した。形質転換されたヒト胎児293 細胞を、10%FCS 含有DMEM培地で約2日間培養した後、0.4 mg/ml ジェネティシン (LIFE TECHNOLOGIES 社製) を含む10%FCS 含有DMEMにて約2週間培養して、形質転換体を得た。この形質転換体を、約50%コンフルエントになるまで培養し、1 %ニュートリドーマ (ベーリングラー・マンハイム社製) を含むDMEM培地と交換し、培養を継続した。約1週間ごとに培地を交換しながら、3週間から4週間培養を続けた。この培地を遠心し、培養上清を回収した後、VacuCap[™] (Gelman Sciences 社製) を用いて濾過した。約7Lの培養上清から、HiTrap Protein G (ファルマシア社製) を用いて、添付のプロトコールに従いカラムクロマトグラフィーを行い、MPL-IgG を精製した。

【0029】試験例3

ELISA 法を用いたトロンボポエチンと被験化合物との競合実験

マイクロタイター平板ウェルに、100 μ l のPBS(−)で希釈した10 ng の MPL-IgG を4℃で終夜被覆した。被験体は被験化合物をDMSOに溶解後、PBS(−) / 0.1% BSA / 0.05% Tween 20 を用いて、最終DMSO含有率が5%となるようにトロンボポエチン (R&D 社製) 溶液（最終濃*

* 度 1×10^{-10} M）と混ぜ合わせて作製した。ウェルより MPL-IgG 溶液を取り除き、被験体を添加し、室温で1時間以上被覆した。この液を取り除き、200 μ l のPBS(−) / 0.05% Tween 20でウェル底面を洗った後、ヤギ Anti-human TPO Neutralizing Antibody (R&D 社製) で、室温にて1時間以上インキュベートした。200 μ l のPBS(−) / 0.05% Tween 20でウェルを洗った後、100 μ l のTMB 溶液 (DAKO 社製) を加え室温で5分間インキュベートした。100 μ l の1M H₂SO₄ (和光純薬社製) を加え反応を停止した。光学密度を450nm にて解析し、被験化合物を加えていない時のトロンボポエチンの結合を100%として、被験化合物によるトロンボポエチンの結合抑制を調べ、トロンボポエチンレセプターへの親和性を評価した。結果を図1に示す。この結果から明らかのように、本発明化合物はトロンボポエチンレセプターへの優れた親和性を示した。

【0030】

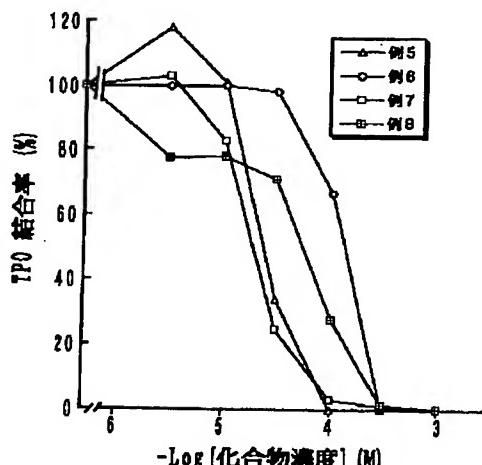
【発明の効果】 本発明の前記一般式(I)で示される1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩は、トロンボポエチンレセプターへの優れた親和性を有しており、血小板産生調節剤として極めて有用である。

【0031】

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明化合物のトロンボポエチン (TPO) の結合抑制作用を測定し、本発明化合物のトロンボポエチンレセプターへの親和性を示した図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 岩崎 信彦
福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72)発明者 池田 佳隆
福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内